

**LUCIANA GARCIA FERREIRA**

**ANÁLISE ESTRUTURAL DE POLISSACARÍDEOS  
POTENCIALMENTE BIOATIVOS: FUCANAS SULFATADAS  
DE ALGAS PARDAS (PHAEOPHYTA)**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica,  
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica,  
Departamento de Bioquímica e Biologia  
Molecular, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eugênia Duarte  
Nosedá

Co-Orientador: Prof. Dr. Miguel D. Nosedá

**CURITIBA**

**2007**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS .....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>ix</b>
<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS.....	1
1.2. POLISSACARÍDEOS DE ALGAS PARDAS .....	2
1.2.1 Ácidos Algínicos .....	2
1.2.2 Laminaranas .....	3
1.2.3 Fucanas Sulfatadas .....	5
1.2.4 Estrutura X Atividade Biológica das Fucanas Sulfatadas .....	11
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 Objetivos Específicos .....	18
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 MATERIAL .....</b>	<b>19</b>
3.2 COLETA E PROCESSAMENTO .....	20
3.3 MÉTODOS ANALÍTICOS GERAIS.....	20
3.4 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS FUCANAS DA ALGA PARDA	
<i>L. variegata</i> .....	21
3.5 CARBOXIRREDUÇÃO .....	21
3.6. DESSULFATAÇÃO POR TRATAMENTO SOLVOLÍTICO .....	22
3.6.1 Preparo do Sal de Piridônio.....	22
3.6.2 Solvólise .....	22
3.7 METILAÇÃO .....	23
3.8 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	23
3.8.1 Cromatografia de Troca Iônica .....	23
3.8.2 Cromatografia Líquido-Gasosa (CLG) .....	24
3.8.3 Cromatografia Líquido-Gasosa Acoplada à Espectroscopia de Massa (CLG- EM).....	24

3.8.4 Cromatografia de Gel Permeação (GPC - HPSEC-MALLS) –	
Análise de Homogeneidade e Massa Molecular.....	25
3.9 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA	
NUCLEAR (RMN) .....	27
3.9.1 Técnica de RMN Monodimensional: RMN DE $^{13}\text{C}$ .....	27
3.9.2 Técnica de RMN Bidimensional: HMQC.....	27
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	28
4.1 EXTRAÇÃO DAS FUCANAS DA ALGA PARDA <i>L. variegata</i> .....	28
4.2 PURIFICAÇÃO E FRACIONAMENTO DAS FUCANAS DA ALGA	
PARDA <i>L. variegata</i> .....	31
4.3 CARBOXIRREDUÇÃO DE Q1-0,4 .....	39
4.4 ANÁLISE DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO Q1-0,4CR.....	42
4.5 ANÁLISES DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DAS FRAÇÕES Q1-0,4; Q1-0,4CR E	
Q1-0,4CRD. ....	48
4.6 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO Q2-0,6 .....	54
4.7 CARBOXIRREDUÇÃO E ANÁLISES DE METILAÇÃO DA FRAÇÃO Q2-0,6 .....	58
4.8 ANÁLISES DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q2-0,6 .....	64
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	71
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	72
<b>ANEXO</b> .....	80

## LISTA DE ESQUEMAS E FIGURAS

FIGURA	1 – FOTO DA ALGA PARDA <i>L. variegata</i> .....	19
ESQUEMA 1 - EXTRAÇÃO DAS FUCANAS DA ALGA PARDA	<i>L. variegata</i> .....	29
FIGURA	2 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO LVQ .....	30
ESQUEMA 2 - PURIFICAÇÃO DE LVQ POR CROMATOGRAFIA DE TROCA	IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL .....	31
FIGURA	3 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q1 .....	33
ESQUEMA 3 - PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO Q1 POR CROMATOGRAFIA DE	TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL .....	36
FIGURA	4- ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE POR HPSEC-MALLS DA	
	FRAÇÃO Q1-0,4 .....	38
FIGURA	5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DO PROCESSO DE	
	CARBOXIRREDUÇÃO .....	39
FIGURA	6 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q1-0,4 .....	51
FIGURA	7 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q1-0,4CR .....	52
FIGURA	8 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q1-0,4CRD .....	53
ESQUEMA 4 - PURIFICAÇÃO DE LVQ E Q2 POR CROMATOGRAFIA DE	TROCA IÔNICA EM DEAE-SEPHACEL .....	54
FIGURA	9 - ANÁLISE DE HOMOGENEIDADE DE Q2-0,6 POR	
	HPSEC-MALLS .....	57
ESQUEMA 5 - CARBOXIRREDUÇÃO E DESSULFATAÇÃO DA FRAÇÃO	Q2-0,6 .....	58
FIGURA	10 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q2 .....	67
FIGURA	11 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q2-0,6 .....	68
FIGURA	12 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q2-0,6D .....	69
FIGURA	13 - ESPECTRO DE RMN DEPT DA FRAÇÃO Q2-0,6D .....	70
ANEXO	- ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DA FRAÇÃO Q3 .....	81

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE LVQ (FRAÇÃO BRUTA) E QL a Q5 .....	35
TABELA 2 - ANÁLISES QUÍMICAS E DE COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES Q1-H <sub>2</sub> O A Q1-0,5 .....	37
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DE Q1-0,4, Q1-0,4CR E Q1-0,4CR* .....	41
TABELA 4 - PRINCIPAIS DERIVADOS METILADOS OBTIDOS DAS FRAÇÕES Q1-0,4 CR E Q1-0,4CRD .....	47
TABELA 5 - RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DE Q2-0,5 A Q2-1,0.....	56
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E ANÁLISE DE ÁCIDOS URÔNICOS DE Q2-0,6, Q2-0,6CR*, Q2-0,6D E Q2-0,6DCR.....	59
TABELA 7 - PRINCIPAIS DERIVADOS METILADOS OBTIDOS DAS FRAÇÕES Q2-0,6 CR* E Q2-0,6CRD .....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**Ara:** Arabinose

**CLAE:** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

**CLG:** Cromatografia Líquida Gasosa;

**CLG-EM:** Cromatografia Líquida Gasosa acoplada a espectrometria de massa;

**D<sub>2</sub>O:** óxido de deutério;

**DMSO:** dimetil sulfóxido;

**Fuc:** Fucose

**Gal:** Galactose

**Glc:** Glucose

**HMQC:** *Heteronuclear Multiple Quantum Correlation Spectroscopy*;

**HPSEC-MALLS:** Cromatografia de Exclusão Estérica de Alta Pressão acoplada a Detector de Índice de Refração Diferencial e Espalhamento de Luz em Multiângulos;

**J:** constante de acoplamento;

**KDa:** Kilodaltons

**LV:** fração bruta de fucanas obtida de extração aquosa à 25° C;

**LVQ:** fração bruta de fucanas obtida de extração aquosa à 100° C;

**Man:** Manose

**Mw:** Massa molecular média

**nd:** não determinado

**ppm:** parte por milhão;

**Q-1:** fração de fucanas obtida da purificação de LVQ em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,5 M;

**Q-2:** fração de fucanas obtida da purificação de LVQ em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 1,0 M;

**Q-3:** fração de fucanas obtida da purificação de LVQ em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 1,5 M;

**Q-4:** fração de fucanas obtida da purificação de LVQ em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 2,0 M;

**Q-5:** fração de fucanas obtida da purificação de LVQ em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 4,0 M;

**Q1-0,1:** fração obtida da purificação de Q1 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,1 M;

**Q1-0,2:** fração obtida da purificação de Q1 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,2 M;

**Q1-0,3:** fração obtida da purificação de Q1 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,3 M;

**Q1-0,4:** fração obtida da purificação de Q1 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,4 M;

**Q1-0,4CR:** fração Q1-0,4 carboxirreduzida

**Q1-0,4CR\*:** fração Q1-0,4 carboxirreduzida com NaBD<sub>4</sub>

**Q1-0,4CRD:** fração Q1-0,4 carboxirreduzida e dessulfatada

**Q1-0,5:** fração obtida da purificação de Q1 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,5 M;

**Q2-0,5:** fração obtida da purificação de Q2 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,5 M;

**Q2-0,6:** fração obtida da purificação de Q2 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,6 M;

**Q2-0,6CR:** fração Q2-0,6 carboxirreduzida;

**Q2-0,6CR\*:** fração Q2-0,6 carboxirreduzida com NaBD<sub>4</sub>;

**Q2-0,6DCR:** fração Q2-0,6 dessulfatada e carboxirreduzida;

**Q2-0,7:** fração obtida da purificação de Q2 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,7 M;

**Q2-0,8:** fração obtida da purificação de Q2 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,8 M;

**Q2-0,9:** fração obtida da purificação de Q2 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 0,9 M;

**Q2-1,0:** fração obtida da purificação de Q2 em coluna de troca iônica (DEAE-SEPHACELL), eluída com NaCl 1,0 M;

**Rha:** Ramnose

**RID:** Detector de Índice de Refração;

**RMN:** Ressonância Magnética Nuclear;

**RMN-<sup>13</sup>C:** Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13;

**RMN-<sup>1</sup>H:** Ressonância Magnética Nuclear de Próton;

**TFA:** ácido trifluoracético;

**tr:** traços;

**Xyl:** Xilose

**$[\alpha]_D^{25}$ :** rotação óptica produzida pelo polissacarídeo ao passar pela linha D de uma lâmpada de sódio ( $\lambda = 589,6 \text{ nm}$ ) a  $25^\circ\text{C}$ ;

- : não detectado.



## RESUMO

Algas pardas biossintetizam, além de ácido alginico e laminaranas, fucanas sulfatadas. Sendo o objetivo deste trabalho a determinação da estrutura das fucanas de *Lobophora variegata*, a alga seca e moída foi submetida sequencialmente a extrações aquosas às temperaturas de 25 e 96 °C. O extrato obtido a quente (fração LVQ) foi submetido à purificação por cromatografia em DEAE-SEPHACEL, originando a fração QL, eluída com água, e Q1 - Q5, eluídas com NaCl 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 4,0 M; respectivamente. Tanto Q1 (22,0% de rendimento em relação à LVQ) como Q2 (6,0% de rendimento) foram repurificadas por cromatografia em DEAE-SEPHACEL, cuja variação na concentração teve um incremento de 0,1 M de NaCl para cada eluição. Q1 originou as subfrações Q1-H<sub>2</sub>O e Q1-0,1 – Q1-0,5, enquanto Q2 as subfrações Q2-0,6 a Q2-1,0. Q1-0,4 e Q2-0,6 foram selecionadas como modelos para a caracterização das fucanas sulfatadas de *L. variegata*. Q1-0,4 (ácidos urônicos: 18,2%; sulfato: 16,1%) apresentou como componentes monossacarídicos fucose (37,1%), xilose (31,2%), manose (9,7%), galactose (14,7%) e glucose (7,3%). Q2-0,6, em relação a Q1-0,4, apresenta menor percentagem de ácidos urônicos (11,0%), elevado grau de sulfatação (23,0%) e similares percentagens de monossacarídeos neutros: fucose (42,0%), xilose (24,9%), manose (5,9%), galactose (18,9%) e glucose (7,4%). As análises por CLG-EM dos produtos de hidrólise dos respectivos polímeros carboxirreduzidos indicaram que o ácido urônico é ácido glucurônico. As estruturas químicas destas fucanas foram investigadas por análises de metilação dos polissacarídeos carboxirreduzidos (Q1-0,4CR; Q2-0,6CR) e carboxirreduzidos parcialmente dessulfatados (Q1-0,4CRD; Q2-0,6DCR), bem como por RMN de <sup>13</sup>C. Os resultados obtidos demonstram que Q1-0,4 contém principalmente unidades de fucose 2-, 2,3- e 4-ligadas (~ 27,0% no total). Grupos sulfato esterificam parcialmente o C-3 das unidades 4-ligadas e C-4 das unidades 2,3-ligadas. Unidades terminais não redutoras não substituídas e trissulfatadas de fucose estão presentes em similares percentagens (somando ~ 8,0%). Cerca de 45,0 e 25,0% das unidades de xilose estão presentes como terminais não redutores não substituídos e como unidades 2-ligadas, respectivamente. Uma característica peculiar desta fucana é a presença de xilose sulfatada (terminais não redutores 4-sulfato), as quais perfazem 30,0% do total destas unidades. Para as unidades de manose observa-se uma variedade de derivados di- e tri-substituídos, indicativos de que estas unidades representam pontos de ramificação do polímero. Galactose se apresenta principalmente 6-ligada, enquanto glucose, bem como ácido glucurônico se apresentam na forma 4-ligada e como terminais não redutores. A estrutura química da fucana Q2-0,6 (Mw = 106 KDa), de um modo geral, é similar à de Q1-0,4, diferenciando-se quanto à presença significativa de unidades de galactose 6-ligadas 2,3-di-sulfatadas e 3-ligadas 2-sulfatadas. Os resultados obtidos demonstram que as fucanas investigadas de *L. variegata* são heterofucanas que se diferenciam a nível estrutural fino principalmente pelo grau de sulfatação, percentagem de ácido glucurônico e presença de galactose sulfatada. Adicionalmente, estas fucanas apresentam xilose 4-sulfato, as quais são pela primeira vez relatadas como constituintes de fucanas sulfatadas.

## JUSTIFICATIVA

Fucanas são polissacarídeos contendo fucose e grupos O-sulfato, apresentando variável percentagem de outros tipos de monossacarídeos como: xilose, manose, galactose, glucose e ácidos urônicos. Esses polissacarídeos são também denominados heterofucanas.

Este tipo de polissacarídeo sulfatado é sintetizado pelas algas pardas (Phaeophyta), as quais podem também, a depender da espécie, produzir homofucanas. Estas se apresentam constituídas majoritariamente por unidades de fucose sulfatadas.

O grande interesse no estudo destes polímeros deve-se ao grande número de atividades biológicas (anticoagulante, antitumoral, antiviral, antiinflamatória) que a eles são atribuídas.

A estrutura química fina das fucanas sulfatadas é altamente complexa devido à diversidade de componentes monossacarídicos, que apresentam diferentes tipos de ligações glicosídicas, anomeridade, enantiomeridade, com substituintes em diferentes posições, além do alto grau de ramificação.

Deste modo o enfoque deste trabalho é o estudo da estrutura química dos polissacarídeos sulfatados da alga parda *L. variegata*, os quais poderão auxiliar na elucidação da estrutura química de outras fucanas complexas, bem como na correlação entre estrutura e atividade biológica desta classe de biopolímeros sulfatados.